



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101856352 A

(43) 申请公布日 2010.10.13

(21) 申请号 200910049092.1

(22) 申请日 2009.04.10

(71) 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路 320 号

(72) 发明人 王慧 陈涛 侯俊梅 李绵

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 8 页

(54) 发明名称

青蒿素及其衍生物对化疗剂的协同作用

(57) 摘要

提供了青蒿素及其衍生物用于制备化疗增效剂的用途。化疗增效剂与化疗剂联用,用于治疗肿瘤。

1. 青蒿素或其衍生物用于制备用于化疗增效剂的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述青蒿素衍生物选自双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢蒿甲醚、蒿乙醚。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其特征在于,所述化疗增效剂与化疗剂联用。
4. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在于,所述化疗剂选自卡铂、吉西他宾、甲二氯二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、L- 苯基丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥、六甲三聚氰胺、硫替派、二甲磺酸丁酯、亚硝脲氮芥、环己亚硝脲、甲基环己亚硝脲、链脲菌素、氮烯唑胺、氨甲喋呤、氟尿嘧啶、氟尿苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、吉西他宾、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁、长春花碱、长春花新碱、表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷、更生霉素、红必霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素 C、L- 天门冬酰胺酶、干扰素、顺铂、卡铂、米托蒽醌、羟基尿素、甲基苄肼、米托坦、氨鲁米特、强的松、己酸孕酮、甲孕酮、甲地孕酮、己烯雌酚、乙炔雌二醇、它莫西芬、丙酸睾酮、氟羟甲睾酮、氟他胺、醋酸亮丙瑞林。
5. 如权利要求 4 所述的用途,其特征在于,所述化疗剂是卡铂,所述青蒿素衍生物是双氢青蒿素。
6. 如权利要求 4 所述的用途,其特征在于,所述化疗剂是吉西他宾,所述青蒿素及其衍生物选自青蒿素和双氢青蒿素。
7. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在于,所述化疗剂用于治疗肿瘤。
8. 如权利要求 7 所述的用途,其特征在于,所述肿瘤选自卵巢癌、肝癌、霍奇金病、急性和慢性淋巴细胞白血病、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、乳房癌、卵巢癌、肺癌、Wilms 肿瘤、宫颈癌、睾丸癌、软组织肉瘤、原发性巨球蛋白血症、膀胱癌、慢性粒细胞性白血病、原发性脑肿瘤、小细胞性肺癌、胃癌、结肠癌、恶性胰岛素细胞瘤、恶性类癌瘤、恶性黑色素瘤、急性淋巴细胞白血病、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、头颈肿瘤、肺癌、骨原性肉瘤、胰腺癌、毛细胞白血病、横纹肌肉瘤、成神经细胞瘤、皮肤多发性出血性肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织、骨和其它肉瘤、泌尿生殖系统癌、甲状腺癌、食道癌、皮肤癌、恶性高钙血症、类癌、肾细胞癌、子宫粘膜癌、真性红细胞增多症、血小板本质增多症、恶性黑色素瘤、和肾上腺皮质癌。
9. 如权利要求 8 所述的用途,其特征在于,所述肿瘤是卵巢癌。
10. 如权利要求 8 所述的用途,其特征在于,所述肿瘤是肝癌。

青蒿素及其衍生物对化疗剂的协同作用

技术领域

[0001] 本申请涉及医疗领域,具体说,是青蒿素及其衍生物在化疗中作为增效剂的用途。

背景技术

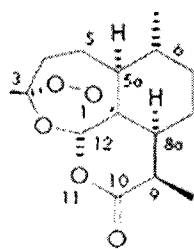
[0002] 青蒿属菊科又名黄花蒿 (*Artemisia annua* L) 是 1 年生草本植物。青蒿素是我国药学工作者于 20 世纪 70 年代初从中药青蒿中提取的倍半萜内酯类抗疟药物,并在此结构基础上又相继合成、半合成出一系列具有抗疟活性的衍生物,如双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢蒿甲醚、蒿乙醚等 (Ringwald P, Bicki J, Basco LK. 等双氢青蒿素针对喀麦隆雅温德的恶性疟原虫临床分离物的体外活性 (In vitro activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon.) 美国热带医学卫生杂志 (*Am J Trop Med Hyg*) 1999 ;61 :187-92 ;Kokwaro GO. 青蒿素衍生物在治疗疟疾中的用途 (Use of artemisinin (qinghaosu) derivatives in the treatment of malaria.) 非洲健康科学杂志 (*Afr J Health Sci*) 1998 ;5 :8-11 ;Haynes RK, Chan WC, Lung CM, 等, 青蒿酮和其他青蒿素的 Fe^{3+} 介导的降解, PfATP6 结合, 和抗疟疾活性 :C-中心基团作为生物活性中间物的不可能性 (The Fe^{2+} -mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins : the unlikelyhood of C-centered radicals as bioactive intermediates.) 化学医学化学 (*Chem Med Chem*) 2007 ;2 :1480-97.)。

[0003] 青蒿素及其衍生物的抗疟活性已得到世界公认,具有起效快、药效高、毒副作用低等优点。除广泛应用于抗疟治疗外,青蒿素类药物还具有其它多种药理作用,如抗血吸虫作用,抗心律失常、平喘,抗内毒素,抗变态反应、红斑狼疮、免疫抑制等作用。随着对青蒿素及其衍生物活性研究的不断深入,揭示了该类化合物还具有一定的抗肿瘤作用,对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用。Efferth 等 (Efferth T, Olbrich A, Bauer R., 人肿瘤细胞系对抗疟疾药物青蒿琥酯、蒿乙醚、和蒿甲醚响应的 mRNA 表达模式 (mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether) 生物化学药理学 (*Biochem Pharmacol.*) 2002 Aug 15 ;64 :617-23) 研究了青蒿琥酯、蒿乙醚及蒿甲醚对 55 种肿瘤细胞的细胞毒作用,结果显示三种化合物对 55 种肿瘤细胞的增殖均有抑制作用,青蒿琥酯作用最为显著,平均半抑制浓度 IC_{50} 是 $12.3 \mu\text{M}$,对包括白血病、结肠癌、黑色素瘤、前列腺癌、肝癌、卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、人低分化鳞状上皮鼻炎癌等在内的多种肿瘤细胞有选择性杀伤作用,青蒿琥酯对白血病细胞和直肠癌细胞有明显的细胞毒作用,其半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 1.11 ± 0.56 和 $2.13 \pm 0.74 \mu\text{M}$ 。Efferth 等 (Efferth T, Olbrich A, Bauer R., 人肿瘤细胞系对抗疟疾药物青蒿琥酯、蒿乙醚、和蒿甲醚响应的 mRNA 表达模式 (mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether) 生物化学药理学 (*Biochem Pharmacol.*) 2002 Aug 15 ;64 :617-23) 分析了青蒿琥酯、蒿乙醚及蒿甲醚作用前后 464 个药物活性相关基

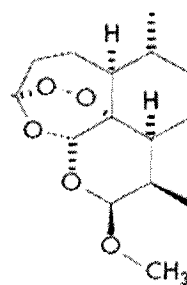
因（包括耐药基因，DNA 损伤修复基因，凋亡调节基因，增殖相关基因，原癌基因，抑癌基因及细胞因子）的表达谱，发现 208 个基因与三种青蒿素类药物抗肿瘤活性相关，主要涉及增殖相关基因、癌基因及抑癌基因，如过氧化氢酶、谷胱氨酸合成酶、硫氧还蛋白过氧化物酶以及硫氧还蛋白还原酶等。Singh NP 和 Nam W 等 (Singh NP, Lai HC., 青蒿素诱导人癌细胞的凋亡 (Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells.) 抗癌研究 (Anticancer Res) 2004 ;24 :2277-80 ;Nam W, Tak J, Ryu JK, 等, 青蒿素及其衍生物对口腔癌细胞的生长抑制和凋亡的作用 (Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells.) 头颈杂志 (Head Neck) 2007 ; 29 :335-40.) 研究发现，青蒿素类药物可以诱导肿瘤细胞凋亡，但其抑癌作用的分子机制仍不清楚。Dell' Eva R 等发现青蒿琥酯能够抑制卡波氏肉瘤细胞的生长，其抑癌作用也是通过诱导细胞凋亡实现的，并且发现青蒿琥酯在体内能够明显降低肿瘤组织血管生成，由此推断抑制血管生成是青蒿素类药物发挥抗肿瘤作用的机制之一 (Dell' Eva R, Pfeiffer U, Vené R, . 等, 抗疟疾药物蒿琥酯对卡波济肉瘤移植肿瘤的体内血管生成和生长的抑制 (Inhibition of angiogenesis In Vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate.) 生物化学药理学杂志 (Biochem Pharmacol) 2004 ;68 :2359-66.)。Huang 等发现双氢青蒿素能够显著抑制大鼠 C6 胶质瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡，双氢青蒿素作用后，Hif-1 α 及下游基因 VEGF 表达均降低 (Huang XJ, Ma ZQ, Zhang WP, Lu YB, Wei EQ., 双氢青蒿素在 C6 胶质瘤细胞中产生细胞毒性作用，并抑制缺氧诱导因子 -1 α 活化 (Dihydroartemisinin exerts cytotoxic effects and inhibits hypoxia inducible factor-1 α activation in C6 glioma cells.) 药物药理学杂志 (J Pharm Pharmacol) 2007 ;59 :849-56.)。双氢青蒿素能够有效抑制卵巢癌细胞的生长，其抑制作用是正常卵巢细胞的 5-10 倍，进一步研究发现该药物能够诱导卵巢癌细胞凋亡及细胞周期 G2 期阻滞 (Jiao Y, Ge CM, Meng QH, Cao JP, Tong J, Fan SJ. 双氢青蒿素是卵巢癌细胞生长的抑制剂 (Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth.) 中国药理学报 (Acta Pharmacol Sin) 2007 ;28 :1045-56.)，该化合物对人淋巴瘤细胞性白血病细胞系 Molt-4 也有一定的细胞毒作用 (Lai H, Singh NP. 接触双氢青蒿素和含铁转铁蛋白引起的选择性癌细胞细胞杀伤作用 (Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin.) 癌症通信 (Cancer Lett) 1995 ;91 :41-6.)。青蒿素分子内的过氧基团在血红素铁介导下分解产生自由基，进而破坏蛋白质等生物大分子，引起一系列细胞反应，导致细胞凋亡。由于肿瘤细胞内铁浓度较正常细胞高出许多，所以对青蒿素类化合物的细胞毒作用更为敏感。研究发现，双氢青蒿素与含铁转铁蛋白 (holo-transferrin) 联合应用能够选择性杀伤人急性淋巴瘤细胞白血病细胞 Molt-4，而对人正常淋巴细胞的细胞毒作用较低，但青蒿素类药物对肿瘤细胞具体作用靶点、信号通路及作用机制还有待进一步研究。青蒿素类化合物的主要代谢产物是双氢青蒿素，因此双氢青蒿素显示出了比原型药更好的活性，但不同的肿瘤对不同青蒿素类药物敏感性不同。

[0004] 以下是本领域几种已知的青蒿素和青蒿素衍生物的化学式：

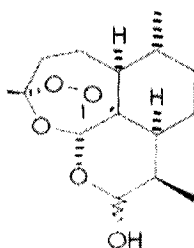
[0005]



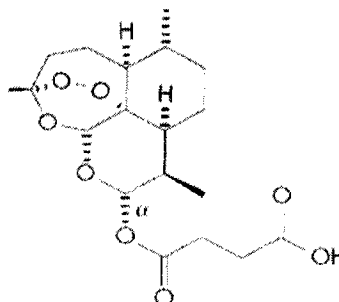
青蒿素 (ART)



蒿甲醚 (ARM)



二氢青蒿素 (DHA)



青蒿琥酯 (ARS)

[0006] 在肿瘤和癌症治疗中,寻找有效的治疗方案,增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,和克服肿瘤的耐药性是研究人员和临床实践人员长期以来的目标。例如,卵巢癌是全世界的妇女健康的重要威胁。在美国,它已成为第四大致死性女性癌症 (Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. 癌症统计学 (Cancerstatistics),2007. 加拿大癌症临床杂志 (CA Cancer J Clin.)2007 ;57 :43-66)。被诊断于病发早期的卵巢癌患者的5年存活率达80% -90%,相比之下,被诊断为晚期的卵巢癌患者存活率却只有不到25% (Mutch DG. 卵巢癌的吉西他滨组合化疗 (Gemcitabine combination chemotherapy of ovarian cancer.) 妇产科癌症 (Gynecol Oncol.)2003 ;90 :S16-20)。而且不幸的是,大多数卵巢癌患者在诊断出是卵巢癌是已至晚期 (Mutch DG. 卵巢癌的吉西他滨组合化疗 (Gemcitabinecombination chemotherapy of ovarian cancer.) 妇产科癌症 (Gynecol Oncol.)2003 ;90 :S16-20)。虽然卵巢癌患者的死亡率在过去的数十年并没有发生太大的改变,但是患者的生存期却是得到了稳定的延长改善,这其中大部分的原因要归功于大量新的、更有效的作为手术后辅助性治疗的化疗药物的临床应用 (Mutch DG. 卵巢癌的吉西他滨组合化疗 (Gemcitabine combination chemotherapy of ovariancancer.) 妇产科癌症 (Gynecol Oncol.)2003 ;90 :S16-20 ;Johnston S R. 卵巢癌 :英国国家临床技术研究院 (NICE) 指导推荐的综述 (Ovarian cancer :review of theNational Institute for Clinical Excellence (NICE) guidancerecommendations.) 癌症调查 (Cancer Invest.)2004 ;22 :730-42)。例如,卡铂 (CBP) 便是其中一种很重要的用来治疗早期卵巢癌和癌症转移的辅助化疗药物 (Sorenson CM, Eastman A., 顺二胺二氯铂 (II) 诱导的细胞毒性机制 :G2 停滞和DNA双链断裂的作用 (Mechanism of cis-diaminedichloroplatinum(II)-inducedcytotoxicity :role of G2 arrest and DNA double-strand breaks.) 癌症研究 (Cancer Res.)1988 ;48 :4484-8)。卡铂的主要作用机制是促使细胞内DNA加合物的形成,导致癌细胞周期阻断在G2期并引起随后细胞调亡。虽然卡铂的疗效很好,但其仍不可避免地会产生诸如神经毒性和肾毒性在内的副作用 (Pavelka M, Lucas MF, Russo N. 关于第二

代抗癌药物卡铂的水解机制 (On the Hydrolysis Mechanism of the Second-Generation Anticancer Drug Carboplatin.) 化学 (Chemistry.) 2007 ;13 :10108-101165-7 ;
6. Agarwal R, Kaye SB. 卵巢癌 :克服化疗抗性的策略 (Ovarian cancer :strategies for overcoming resistance to chemotherapy.) 癌症国家研究 (Nat Rev Cancer.) 2003 ;3 :502-16)。因此,仍然需要能够减少副作用的化疗方案。

[0007] 肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,我国是肝癌的高发区,其发病率已上升到恶性肿瘤的第二位 (McCracken M, Olsen M, Chen MS Jr, 等中国、菲律宾、越南、韩国、和日本人种的亚裔美国人中的癌症发生率、死亡率、和相关危险因素 (Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities.) CA 临床癌症杂志 (CA Cancer J Clin) 2007 Jul-Aug ;57 :190-205.)。肝癌的发生与乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染密切相关,此外环境因素如黄曲霉素、酒精、硒元素缺乏等也是导致肝癌发生的重要因素。由于肝癌早期症状不明显,确诊的大多数病人已处于中、晚期。原发性肝癌的首选治疗是手术切除,随着治疗技术的提高,目前术后 5 年生存率已提高至 50% -60%,但由于手术切除只适用直径不超过 5cm,且癌灶数目不超过 3 个的小肝癌 (Ryder SD, 英国胃肠道病学会,肝细胞肝癌 (HCC) 在成年人中的诊断和治疗 (British Society of Gastroenterology. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults.) 胃肠道病学杂志 (Gut) 2003 ;52 增刊 3 :iii1-8.), 此外,是否适合直接手术切除还取决于癌灶部位的血管富集程度及病人个体差异,这些限制导致 90% 左右的肝癌不适合手术治疗,因此非手术治疗方法是不可或缺的,即使是可切除肝癌,术后实施以介入化疗为主的综合性治疗也是必要的。

[0008] 在肝癌的综合治疗中,化疗是最基本的治疗方法,以往对肝癌的化疗药物评价不高,鲜有药物能够有效抑制肝癌的生长和进一步恶化,肝癌对传统化疗药物的反应率低及毒副作用显著是制约抗肿瘤药物临床应用的主要原因。肝癌耐药性与多种耐药基因的表达密切相关,MDR1、MRP、LRP、GSTP1 和 Topo II α 等耐药基因在肝癌中高表达 (Ryder SD, 英国胃肠道病学会,肝细胞肝癌 (HCC) 在成年人中的诊断和治疗 (British Society of Gastroenterology. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults.) 胃肠道病学杂志 (Gut) 2003 ;52 增刊 3 :iii1-8.)。目前肝癌化疗药物的反应率基本在 10% 左右,即使联合化疗也不能有效提高反应率,鲜有药物能够明显延长肝癌病人存活期 (Guo WJ, Yu EX. 化疗栓塞和辐射联合治疗对大肝细胞癌的评价 (Evaluation of combined therapy with chemoembolization and irradiation for large hepatocellular carcinoma.) 英国放射医学杂志 (Br J Radiol) 2000 ;73 :1091-7 ; Aguayo A, Patt YZ. 肝细胞癌的非手术治疗 (Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma). 癌症专题 (Semin Oncol) 2001 ;28 :503-13.)。此外,因肝癌病人大多合并肝硬化,使肝脏代谢药物的能力变差,增添治疗的困难性。因此,有必要开发新的高效低毒药物,增加化疗药物的敏感性和选择性,降低或逆转耐药效应,从天然产物中寻找抗肿瘤活性成分和耐药逆转剂是当前抗肿瘤药物研究的重要发展战略之一 (Notas G, Nifli AP, Kampa M, Vercauteren J, Kouroumalis E, Castanas E. 白藜芦醇对 HepG2 肝细胞癌细胞通过诱导细胞周期停滞和 NOS 活化发挥其抗增殖作用 (Resveratrol exerts its anti-proliferative

effect onHepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, andNOS activation.) 生物化学生物物理学报 (Biochem Biophys Acta)2006 ;1760 :1657-66 ;Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. 水飞蓟宾对人肝细胞癌的作用 (Silibinin Efficacy against HumanHepatocellular Carcinoma.) 临床癌症研究 (Clin Cancer Res)20051 ;11 :8441-8.)。近年来,随着吉西他宾 (gemcitabine) 等新药的出现,肝癌药物治疗已取得一定进展,原发性肝癌的药物反应率已升至 15-20%,但是仍然较低。目前的化疗药物难以满足单药化疗的要求,因此多药物联合化疗的治疗方案仍然是肝癌治疗的主要研究方向。吉西他宾是一种新型人工合成嘧啶核苷类药物,具有广谱的抗肿瘤活性,术后应用能够提高肝癌的治疗效果,降低复发率和转移率,患者中位生存时间可延长至 34 周 (Yang TS, Lin YC, Chen JS, Wang HM, Wang CH. 吉西他宾对患有恶化肝细胞癌的病人的二期研究 (Phase II study of gemcitabine inpatients with advanced hepatocellular carcinoma.) 癌症杂志 (Cancer)2000 ;89 :750-6 ;Ulrich-Pur H, Kornek GV, Fiebigger W, Schüll B, Raderer M, Scheithauer W. 双周一次的高剂量吉西他宾对恶化肝细胞癌的治疗 (Treatment ofadvanced hepatocellular carcinoma with biweekly high-dose gemcitabine.) 癌症学 (Oncology)2001 ;60 :313-5.)。然而,吉西他宾的药物反应率仍然不够理想,还需要寻求与其它药物联合应用,提高肝癌治疗效果方案。

[0009] 因此,对于肿瘤化疗来说,还需要寻求更好的化疗增效剂和更好的治疗方案,从而提高肿瘤对化疗的敏感度并降低其对化疗的耐药性。

[0010] 目前,尚没有对于青蒿素及其衍生物与化疗剂联用治疗肿瘤的任何报道。

发明内容

[0011] 因此,本发明在此提供了青蒿素及其衍生物用于制备化疗增效剂的用途。

[0012] 优选青蒿素衍生物是那些具有青蒿素相同或相当活性的衍生物。更优选的,选自双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢蒿甲醚、和蒿乙醚。

[0013] 在本发明的一个方面,化疗增效剂与化疗剂联用。优选化疗剂是本领域已知的化疗中使用的制剂,更优选选自卡铂、吉西他宾、甲二氯二乙胺 (NH₂)、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥 (L- 苯基丙氨酸氮芥)、苯丁酸氮芥、六甲三聚氰胺、硫替派、二甲磺酸丁酯、亚硝脲氮芥 (BCNU)、环己亚硝脲 (CCNU)、甲基环己亚硝脲 (甲基-CCNU)、链脲菌素 (链脲霉素)、氮烯唑胺 (DTIC 二甲基三氮烯基咪唑羧酰胺)、氨甲喋呤 (甲氨喋呤)、氟尿嘧啶 (5- 氟尿嘧啶 ;5-FU)、氟尿苷 (氟脱氧尿苷 ;FdR)、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (阿糖胞苷)、吉西他宾、巯基嘌呤 (6- 巯基嘌呤 ;6-MP)、硫鸟嘌呤 (6- 硫鸟嘌呤 ;TG)、喷司他丁 (2- 去氧助间型霉素)、长春花碱 (VLB)、长春花新碱、表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷、更生霉素 (放线菌素D)、红必霉素 (柔红霉素 ;红比霉素)、阿霉素、博来霉素、普卡霉素 (光神霉素)、丝裂霉素 C、L- 天门冬酰胺酶、干扰素、顺铂 (cis-DDP)、卡铂、米托蒽醌、羟基尿素、甲基苄肼 (N- 甲基肼,MIH)、米托坦 (o, p' -DDD)、氨鲁米特、强的松、己酸孕酮、甲孕酮、甲地孕酮、己烯雌酚、乙炔雌二醇、它莫西芬、丙酸睾酮、氟羟甲睾酮、氟他胺、醋酸亮丙瑞林。

[0014] 在该方面的一个优选例中,化疗剂是卡铂,青蒿素衍生物是双氢青蒿素。

[0015] 在该方面的另一个优选例中,化疗剂是吉西他宾,青蒿素及其衍生物选自青蒿素和双氢青蒿素。

[0016] 在该方面的还有一个优选例中,化疗剂用于治疗肿瘤。优选肿瘤选自卵巢癌、肝癌、霍奇金病、急性和慢性淋巴细胞白血病、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、乳房癌、卵巢癌、肺癌、Wilms 肿瘤、宫颈癌、睾丸癌、软组织肉瘤、原发性巨球蛋白白血病、膀胱癌、慢性粒细胞性白血病、原发性脑肿瘤、小细胞性肺癌、胃癌、结肠癌、恶性胰岛素细胞瘤、恶性类癌瘤、恶性黑色素瘤、急性淋巴细胞白血病、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、头颈肿瘤、肺癌、骨原发性肉瘤、胰腺癌、毛细胞白血病、横纹肌肉瘤、成神经细胞瘤、皮肤多发性出血性肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织、骨和其它肉瘤、泌尿生殖系统癌、甲状腺癌、食道癌、皮肤癌、恶性高钙血症、类癌、肾细胞癌、子宫粘膜癌、真性红细胞增多症、血小板本质增多症、恶性黑色素瘤、和肾上腺皮质癌。更优选的,肿瘤是卵巢癌或肝癌。

附图说明

[0017] 图 1A-E 显示了四种青蒿素类化合物对人肝癌细胞具有选择性杀伤作用。图 1A-E 分别是人肝癌细胞 HepG2 (A), Hep3B (B), Huh-7 (C), BEL-7404 (D) 及人正常肝细胞 7702 (E)。

[0018] 图 2 显示了青蒿素和双氢青蒿素抑制人肝癌细胞增殖,并对吉西他宾的抗肝癌活性的增效作用。

[0019] 图 3 显示了青蒿素和双氢青蒿素诱导人肝癌细胞凋亡,并对吉西他宾的抗肝癌活性的增效作用。

[0020] 图 4 显示了青蒿素和双氢青蒿素联合吉西他宾对于裸鼠人肝癌移植瘤的协同抑制作用。图 4A 显示了荷 HepG2 移植瘤裸鼠用 50mg/kg 青蒿素联合 80mg/kg 吉西他宾进行治疗,图 4B 显示了荷 Hep3B 移植瘤裸鼠用 50mg/kg 青蒿素联合 80mg/kg 吉西他宾治疗,图 4C 显示了 HepG2 移植瘤裸鼠用 50mg/kg 双氢青蒿素联合 80mg/kg 吉西他宾治疗,图 4D 显示了荷 Hep3B 移植瘤裸鼠用 50mg/kg 双氢青蒿素联合 80mg/kg 吉西他宾进行治疗。

[0021] 图 5 显示了青蒿素和双氢青蒿素以及联合吉西他宾的体内毒副作用示意图。其中 (A) 显示了荷 HepG2 移植瘤裸鼠用 50mg/kg、100mg/kg 青蒿素单药治疗,及青蒿素联合吉西他宾治疗,各组裸鼠体重变化趋势, (B) 显示了荷 Hep3B 移植瘤裸鼠用 50mg/kg、100mg/kg 青蒿素单药治疗,及青蒿素联合吉西他宾治疗,各组裸鼠体重变化趋势, (C) 显示了荷 HepG2 移植瘤裸鼠用双氢青蒿素单药或与吉西他宾联合治疗,裸鼠体重变化情况, (D) 显示了荷 Hep3B 移植瘤裸鼠用双氢青蒿素单药或与吉西他宾联合治疗对裸鼠体重的影响。

[0022] 图 6 显示了 DHA 与 CBP 联合给药对于卵巢癌的作用。图 6A 显示了 DHA 与 CBP 联用时对于卵巢癌细胞的杀伤作用。图 6B 显示了 DHA 与 CBP 联用时对于卵巢癌细胞的生长抑制作用。图 6C 显示了流式细胞计数中用 Annexin-V 进行染色并对凋亡细胞进行的流式细胞计数。图 6D 显示了两种癌细胞的凋亡指数。

[0023] 图 7A 和图 7B 分别显示了用 DHA、CBP 单独、DHA 和 CBP 联合治疗 A2780 和 OVCAR-3 卵巢癌裸鼠肿瘤的效果。左栏是肿瘤重量对天数作图,右栏是裸鼠的体重对天数作图。

具体实施方式

[0024] 本发明的青蒿素及其衍生物可作为化疗增敏剂,提高化疗的效率,同时保证化疗的安全性。下面的实施例给出了截然不同的两种化疗剂和治疗不同肿瘤的效果。本发明的青蒿素具有广谱的化疗增敏作用。

[0025] 为了将本发明与另一化疗试剂联用,可将联合另一化疗剂的青蒿素或其衍生物给予动物,采用的形式要能在动物中有效发挥它们的联合抗肿瘤作用。因此以有效剂量提供这些试剂,并且在一段时间内让它们在肿瘤脉管系统和肿瘤环境中有效发挥联合作用。为了实现这一目的,可将单一组合物或两种不同的组合物用不同的给药途径,同时对动物给予青蒿素和化疗剂。

[0026] 另外,青蒿素或其衍生物的给药可在化疗前或后(间隔范围从几分钟到几周)进行。在分别向动物给药的实施例中,一般要确保各次递药的时间间隔不是很长,这样化疗剂和青蒿素或其衍生物依旧能够发挥良好的联合抗肿瘤作用。在这种情况下,考虑两种试剂接触肿瘤的时间为每种约 5 分钟到约 1 周,较佳的是约 12-72 小时(每种),延长时间较佳的是 24-48 小时。在一些情况中,可能需要显著地延长治疗时间,在各次给药之间的时间间隔为几天(2、3、4、5、6 或 7)或几周(1、2、3、4、5、6、7 或 8)。可想象化疗剂或青蒿素给药一次以上是需要的。为了实现肿瘤的消退,可将两种试剂联合都以有效剂量给药以抑制肿瘤的生长,而不考虑给药的时间。

[0027] 许多制剂适合用于本文所述的联合治疗。可考虑的化疗剂包括,如吉西他宾、卡铂、表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷(VP-16)、阿霉素、5- 氟尿嘧啶(5-FU)、喜树碱、放线菌素 -D、丝裂霉素 C 和顺氯铂氨(CDDP)等。

[0028] 如本领域的普通技术人员所知,化疗剂的适合剂量一般是单独给予化疗或与其它化疗剂联合给药的临床治疗中所用量的上下。

[0029] 其它有用的制剂包括干扰 DNA 复制、有丝分裂和染色体分离的化合物。这些化疗化合物包括阿霉素(也称为亚德利亚霉素)、表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷、异搏定、鬼臼霉素等。这些化合物被广泛用在临床治疗肿瘤,通过丸剂静脉注射给药,剂量范围为阿霉素 25-75mg/m²21 天间隔,表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷 35-50mg/m² 静脉注射或以两倍静脉剂量口服。

[0030] 也可用扰乱多核苷酸前体合成和保真性的制剂。特别有用的制剂是那些经历过广泛测试和易于获得的的制剂。制剂如 5- 氟尿嘧啶(5-FU) 优选地用于肿瘤组织,该试剂对靶向肿瘤细胞特别有效。虽然有毒,但 5-FU 可配制在各种载体中应用,包括局部应用,一般用的静脉注射剂量范围为 3-15mg/kg/ 天。

[0031] 表 1 中列出了用于联合治疗的示范化疗剂。本文所列出的每种制剂仅是举例不起任何限制。从这一角度说,本领域技术人员可参见“Remington’ sPharmaceutical Sciences” 第 15 版,33 章,624-652 页。不同的剂量应取决于治疗对象的状况。负责给药的人在任何时候都应确定每个患者的适合剂量。另外,对人给药,制剂应满足无菌、致热原性(pyrogenicity)、一般安全和纯度标准(如 FDAOffice of Biological Standards 所要求的)。

[0032] 表 1 用于肿瘤疾病的化疗剂

[0033]

类别	制剂类型	一般名称	疾病
----	------	------	----

[0034]

烷化剂	氮芥类	甲二氯二乙胺(NH_2)	霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤
		环磷酰胺 异环磷酰胺	急性和慢性淋巴细胞白血病、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、乳房、卵巢、肺、Wilms 肿瘤、子宫颈、睾丸、软组织肉瘤
		苯丙氨酸氮芥(L-苯基丙氨酸氮芥)	多发性骨髓瘤、乳房、卵巢
		苯丁酸氮芥	慢性淋巴细胞白血病、原发性巨球蛋白血症、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤
	氮丙啶和 甲基密胺 (methylnel amines)	六甲三聚氰胺	卵巢
		硫替派	膀胱、乳房、卵巢
	烷基磺酸盐	二甲磺酸丁酯	慢性粒细胞性白血病
	亚硝基脲	亚硝基脲氮芥(BCNU)	霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、原发性脑肿瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑色素瘤
		环己亚硝基脲(CCNU)	霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、原发性脑肿瘤、小细胞性肺癌
		甲基环己亚硝基脲(甲基-CCNU)	原发性脑肿瘤、胃、结肠
		链脲菌素(链脲霉素)	恶性胰岛素细胞瘤、恶性类癌瘤
	三嗪类	氮烯唑胺(DTIC 二甲基三氮烯基咪唑羧酰胺)	恶性黑色素瘤、霍奇金病、软组织肉瘤
抗代谢物	叶酸类似物	氨甲喋呤(甲氨喋呤)	急性淋巴细胞白血病、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、乳房、头和颈、肺、骨原发性肉瘤

[0035]

	嘧啶类似物	氟尿嘧啶 (5- 氟尿嘧啶; 5-FU)	乳房、结肠、胃、胰、卵巢、头和颈、膀胱、皮肤损害恶变前 (局部)
		氟尿苷 (氟脱氧尿苷; FUDR)	
		胞嘧啶阿拉伯糖苷 (阿糖胞苷)	急性粒细胞性白血病和急性淋巴细胞白血病
		吉西他宾	肝癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌
	嘌呤类似物和相关抑制剂	巯基嘌呤 (6- 巯基嘌呤; 6-MP)	急性淋巴细胞白血病、急性和慢性粒细胞性白血病
		硫鸟嘌呤 (6- 硫鸟嘌呤; TG)	急性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞白血病和慢性粒细胞性白血病
		喷司他丁 (2-去氧助间型霉素)	毛细胞白血病、蕈样霉菌病、慢性淋巴细胞白血病
天然产物	长春花生物碱	长春花碱 (VLB)	霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、乳房、睾丸
		长春花新碱	急性淋巴细胞白血病、成神经细胞瘤、Wilms 肿瘤、横纹肌肉瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、小细胞性肺癌
	表鬼臼酯素	表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷 tertiposide	睾丸、小细胞性肺癌和其它肺癌、乳房、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、急性粒细胞性白血病、皮肤多发性出血性肉瘤
	抗菌素	更生霉素 (放线菌素 D)	绒毛膜癌、Wilms 肿瘤、横纹肌肉瘤、睾丸、皮肤多发性出血性肉瘤
		红必霉素 (柔红霉素; 红比霉素)	急性粒细胞性白血病和急性淋巴细胞白血病

[0036]

		阿霉素	软组织、骨和其它肉瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、急性白血病、乳房、泌尿生殖系统、甲状腺、肺、胃、成神经细胞瘤
		博来霉素	睾丸、头和颈、皮肤、食道、肺和生殖泌尿道、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤
		普卡霉素(光神霉素)	睾丸、恶性高钙血症
		普卡霉素(丝裂霉素C)	胃、子宫颈、结肠、乳房、胰、膀胱、头和颈
	酶	L-天门冬酰胺酶	急性淋巴细胞白血病
杂类制剂	生物应答调节剂	干扰素 α	毛细胞白血病、皮肤多发性出血性肉瘤、黑色素瘤、类癌、肾细胞、卵巢、膀胱、非霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、多发性骨髓瘤、慢性粒细胞性白血病
	铂配位复合物	顺铂(cis-DDP) 卡铂	睾丸、卵巢、膀胱、头和颈、肺、甲状腺、子宫颈、子宫粘膜、成神经细胞瘤、骨原发性肉瘤
	蒽二酮	米托蒽醌	急性粒细胞性白血病
	取代尿素类	羟基尿素	慢性粒细胞性白血病、真性红细胞增多症、血小板本质增多症、恶性黑色素瘤
	甲基胍衍生物	甲基苄胍(N-甲基胍, MIH)	霍奇金病
	肾上腺皮质遏抑剂	米托坦(o, p'-DDD)	肾上腺皮质
		氨鲁米特	乳房
激素和拮抗剂	肾上腺皮质类固醇	强的松(若干其它可得 的等价制剂)	急性和慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、乳房

[0037]

	孕激素	己酸孕酮 甲孕酮 甲地孕酮	子宫粘膜、乳房
	雌激素	己烯雌酚 乙炔雌二醇(其它可得的制剂)	乳房、前列腺
	抗雌激素药	它莫西芬	乳房
	雄激素	丙酸睾酮 氟羟甲睾酮(其它可得的制剂)	乳房
	抗雄激素	氟他胺	前列腺
	促性腺激素释放激素类似物	醋酸亮丙瑞林	前列腺

[0038] 本文所述的“青蒿素衍生物”除了文中提到的那些以外,还包括本领域技术人员能够通过简单的化学方法,例如取代、还原等方法对于骨架上的侧链基团进行修饰,而仍然保留青蒿素活性的那些衍生物。这些衍生物的合成方法可以参考现有技术中的教科书。同时,青蒿素衍生物还包括其各种酸碱形式的盐、水合物、光学异构体等。

[0039] 下文所述的实施例是为了更好的理解本发明,而不起限制作用。

[0040] 实施例

[0041] 实施例 1 青蒿素及其衍生物对肝癌细胞的杀伤作用

[0042] 本实验采用了 4 种 p53 遗传背景不同的肝癌细胞系用于药物活性体外筛选,分别是表达野生型 p53 的 HepG2 细胞, p53 缺失的 Hep3B 细胞, 以及 p53 突变的 BEL-7404 和 Huh-7 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),对青蒿素(ART)、双氢青蒿素(DHA)、蒿甲醚(ARM)和青蒿琥酯(ARS)(浙江义乌高登精细化工有限公司)的细胞毒作用进行筛选。

[0043] 四种青蒿素类化合物:ART、DHA、ARM 及 ARS 分别作用于人肝癌细胞 HepG2(图 1A), Hep3B(图 1B), Huh-7(图 1C), BEL-7404(图 1D) 及人正常肝细胞 7702(图 1E)。细胞接种于 96 孔板,加入不同浓度青蒿素类化合物 ART、DHA、ARM 及 ARS (0, 1, 5, 10, 25, 50, 和 100 $\mu\text{mol/L}$),并设相同浓度的 DMSO 对照和不加细胞的空白对照。药物作用 48 小时后,吸去培养液加入 MTT 于 37℃温育 3 小时,然后吸去培养液,加入 100 μl DMSO,振荡使结晶充分溶解,读取 540nm 光密度值(OD 值),结果来自三次独立实验。*, $p < 0.05$ 对对照; **, $p < 0.01$ 对对照。

[0044] 结果显示,青蒿素(ART)对 4 种人肝癌细胞 HepG2、Hep3B、BEL-7404 和 Huh-7 均

具有显著抑制作用,半数抑制浓度 IC₅₀ 分别是 13.98 μM、10.4 μM、8.9 μM 和 9.9 μM,而对人正常肝细胞 7702 没有明显杀伤作用,半数抑制浓度 IC₅₀ 为 60.9 μM,青蒿素对肝癌细胞的杀伤作用是正常肝细胞的 6 倍。HepG2 细胞经不同浓度 ART (1-100 μM) 作用 48 小时后,细胞存活率从 84.7% 降至 15.5% (p < 0.01),相同条件下,青蒿素对 Hep3B、BEL-7404 和 Huh-7 细胞也有明显的细胞毒作用。

[0045] 对双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯三种青蒿素衍生物体外抗肝癌活性检测发现,构型差异对化合物的抗肿瘤活性影响较大。双氢青蒿素 DHA 对人肝癌细胞有显著的生长抑制作用,对肝癌细胞 HepG2、Hep3B、BEL-7404 和 Huh-7 的抑制程度与青蒿素相当,但对正常肝细胞的细胞毒性低于青蒿素,其半数抑制浓度高达 167.7 μM,表明双氢青蒿素能够特异性的抑制肝癌细胞的生长而对正常肝细胞没有明显杀伤作用。青蒿琥酯 (ARS) 对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 生长抑制作用较青蒿素和双氢青蒿素弱,半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 20.5 μM 和 39.4 μM,但对 Huh-7 和 BEL-7404 细胞显示出较强的生长抑制作用,药物作用 48 小时后,半数抑制浓度分别为 9.22 μM 和 15.0 μM,而对正常肝细胞 7702 的细胞毒性甚微 (IC₅₀ > 500 μM)。蒿甲醚 (ARM) 对人肝癌细胞的生长抑制作用较差,作用于 HepG2、Hep3B、BEL-7404 和 Huh-7 细胞后半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 54.8 μM、51.5 μM、31.4 μM 和 31.8 μM,其对正常肝细胞的杀伤作用较弱,IC₅₀ 为 492 μM。四种青蒿素类化合物的 20%、50%、80% 抑制浓度见表 1。

[0046] 表 1 青蒿素及其衍生物双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚对人肝癌细胞 HepG2、Hep3B、BEL-7404、Huh-7 及正常肝细胞 7702 生长的抑制率

[0047]

细胞系	抑制浓度 (μM)	ART	DHA	ARM	ARS
7702	IC ₂₀	3.6	3.8	7.9	7.3
	IC ₅₀	60.9	167.7	492	>500
	IC ₈₀	>500	>500	>500	>500
HepG2 (p53 野生型)	IC ₂₀	1.3	1.2	2.6	1.3
	IC ₅₀	13.98	13.35	54.8	20.5
	IC ₈₀	145.1	145.8	>500	338.2
Hep3B (p53 缺失)	IC ₂₀	0.97	0.96	2.4	1.5
	IC ₅₀	10.4	10.3	51.5	39.4
	IC ₈₀	113.3	110.7	>500	>500
Huh-7 (p53 突变型)	IC ₂₀	0.7	0.7	1.2	0.6
	IC ₅₀	8.9	9.6	31.4	9.22
	IC ₈₀	115.4	130.9	>500	146.1
BEL-7404 (p53 突变型)	IC ₂₀	0.9	0.7	2.4	1.0
	IC ₅₀	9.9	9.3	31.78	15.0
	IC ₈₀	107.1	129.7	> 500	215.4

[0048]

[0049] 比较四种青蒿素类化合物的半数抑制浓度 (图 2A-D) 可见,青蒿素和双氢青蒿素对肝癌细胞的生长抑制活性最高,且对正常肝细胞均无明显杀伤作用;青蒿琥酯次之;蒿甲醚对肝癌细胞的细胞毒作用最弱。青蒿素及其衍生物对四种肝癌细胞的平均半数抑制浓度分别为:10.8 μM (ART), 10.6 μM (DHA), 21.0 μM (ARS) 及 42.3 μM (ARM),而四种青蒿素类化合物对人正常肝细胞的半数抑制浓度在 60.9-500 μM 之间。

[0050] 实施例 2 青蒿素及其衍生物联合吉西他宾 (gemcitabine) 对人肝癌细胞生长的抑制作用

[0051] 如实施例 1 所示, 青蒿素及双氢青蒿素体外单独应用均能够显著抑制肝癌细胞的增殖, 我们对其是否具有化疗增敏作用进行了检测, 青蒿素及双氢青蒿素分别联合吉西他宾作用于人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B, 观察联合用药对细胞生长的抑制作用。

[0052] HepG2 细胞分别用 $10 \mu\text{mol/L}$ ART (A) 及 $10 \mu\text{mol/L}$ DHA (B) 单独处理不同时间 (0, 24, 48, 72, 96 小时), 然后加入 MTT, 读取不同作用时间的 OD 值, 绘制细胞生长曲线, 相同条件 Hep3B 细胞分别用 $10 \mu\text{mol/L}$ ART (C) 及 $10 \mu\text{mol/L}$ LDHA (D)。 $10 \mu\text{mol/L}$ 青蒿素及双氢青蒿素与 $10 \mu\text{g/L}$ 吉西他宾联合作用于 HepG2 和 Hep3B 细胞 (0, 24, 48, 72, 96 小时), 用 MTT 法进行检测。结果来自三次独立实验。*, $P < 0.05$ 对对照; **, $P < 0.01$ 对对照。

[0053] 图 2 显示了实验结果。

[0054] 结果显示, 青蒿素对 HepG2 细胞的生长抑制作用, 至少部分是通过抑制细胞增殖实现的: 药物处理 24 小时的生长抑制率已经达到 69% ($p < 0.05$), 作用 48 小时后的生长抑制率为 92% ($p < 0.05$), 作用 72 小时后的抑制率为 96% ($p < 0.05$) (见图 2A); 双氢青蒿素也能够有效抑制 HepG2 细胞的增殖: 药物作用不同时间点的抑制率分别为, 24 小时 74% ($p < 0.05$)、48 小时 93% ($p < 0.05$)、72 小时 97% ($p < 0.05$) (见图 2B), 双氢青蒿素对 HepG2 细胞增殖的抑制作用略高于青蒿素。

[0055] 青蒿素对 Hep3B 细胞增殖也具有抑制作用, 相同条件下, 药物作用 24 小时的抑制率为 74% ($p < 0.05$), 48 小时抑制率为 81% ($p < 0.05$), 72 小时抑制率为 94% ($p < 0.05$), 96 小时抑制率达到 98% ($p < 0.05$) (见图 2C); 双氢青蒿素对 Hep3B 细胞增殖抑制作用与青蒿素相当, 24 小时抑制率为 71% ($p < 0.05$)、48 小时抑制率为 84% ($p < 0.05$)、96 小时抑制率为 99% ($p < 0.05$) (见图 2D)。以上结果表明青蒿素及双氢青蒿素能够显著抑制人肝癌细胞增殖, 对 HepG2 (p53WT) 和 Hep3B (p53 null) 细胞具有相同程度的抑制作用, 两种化合物的抑制作用无显著差异。因此, 青蒿素及双氢青蒿素对人肝癌细胞的抑制作用至少部分是通过抑制细胞增殖实现的。

[0056] 在与吉西他宾的协同作用上, 发明人比较了吉西他宾单用和与青蒿素及其衍生物联用的效果。

[0057] 吉西他宾单药作用于 HepG2 细胞显示出一定的生长抑制效应 (见图 2A), 青蒿素联合吉西他宾对 HepG2 细胞具有显著生长抑制作用, 两药联合表现出协同作用: 24 小时的生长抑制率为 74% ($p < 0.05$), 48 小时后的生长抑制率为 95% ($p < 0.05$), 处理 72 小时后的抑制率为 98% ($p < 0.05$), 96 小时后则完全抑制 (100%, $p < 0.05$) (见图 2A)。双氢青蒿素联合吉西他宾作用, 在不同时间点均显示出最大的抑制活性, 其对细胞增殖的抑制作用不仅高于单药, 还优于青蒿素与吉西他宾联合: 24 小时的生长抑制率为 76% ($p < 0.05$), 48 小时后抑制率为 95% ($p < 0.05$), 处理 72 小时后抑制率为 99% ($p < 0.05$), 96 小时后抑制率达到 100% ($p < 0.05$) (见图 2B)。

[0058] 吉西他宾单独作用于 Hep3B 细胞也显示出较强的生长抑制效应 (见图 2C), 青蒿素联合吉西他宾对 Hep3B 细胞增殖的抑制作用加强: 药物联合处理 24 小时的生长抑制率为 68% ($p < 0.05$), 处理 48 小时后的生长抑制率为 85% ($p < 0.05$), 处理 72 小时后的抑制率为 96% ($p < 0.05$), 96 小时抑制 99% ($p < 0.05$) (见图 2C)。双氢青蒿素联合吉西

他宾处理 Hep3B 细胞,24 小时的生长抑制率为 73% ($p < 0.05$),作用 48 小时后抑制率为 87% ($p < 0.05$),处理 72 小时后抑制率为 99% ($p < 0.05$),96 小时后抑制率为 100% ($p < 0.05$) (见图 2D),不同时间点的抑制作用均强于吉西他宾单药作用。

[0059] 吉西他宾单药对 HepG2 细胞增殖抑制作用略强于 Hep3B 细胞,青蒿素联合吉西他宾对 HepG2 细胞的增殖抑制作用也略强于 Hep3B 细胞。双氢青蒿素联合吉西他宾作用于两种肝癌细胞,对 HepG2 的抑制作用更为显著。比较青蒿素和双氢青蒿素对吉西他宾的增效作用发现,在 HepG2 和 Hep3B 细胞中,双氢青蒿素联合吉西他宾均显示出最强的抑制增殖作用,其活性高于双氢青蒿素单药、吉西他宾单药以及青蒿素联合吉西他宾。因此,青蒿素和双氢青蒿素在体外均能增加吉西他宾的细胞毒作用,尤其是双氢青蒿素对吉西他宾具有更强的化疗致敏作用,其高效低毒的特点使之有望作为化疗增效剂,应用于肝癌的临床联合化疗。

[0060] 实施例 3 青蒿素及双氢青蒿素联合吉西他宾诱导人肝癌细胞凋亡

[0061] 发明人研究了青蒿素和双氢青蒿素对人肝癌细胞生长抑制作用与细胞凋亡的关系,具体实验如下。结果如图 3 所示:

[0062] 青蒿素及双氢青蒿素诱导人肝癌细胞 HepG2(A) 和 Hep3B(B) 发生凋亡:处于对数生长期的 HepG2 和 Hep3B 细胞分别用 0,1,10,25,50 $\mu\text{mol/L}$ 的青蒿素或双氢青蒿素处理 48 小时,收集贴壁细胞及死亡细胞,进行 Annexin V/PI 双染色,流式细胞仪定量检测凋亡细胞比例,早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞合并作为评估凋亡指数。

[0063] 青蒿素及双氢青蒿素对吉西他宾的增效作用:HepG2(C) 和 Hep3B(D) 细胞用 10 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿素或双氢青蒿素单独处理或联合 10 $\mu\text{g/L}$ 吉西他宾处理 48 小时,按上述方法进行细胞凋亡定量检测。结果来自三次独立实验。*, $p < 0.05$ 对对照;**, $p < 0.01$ 对对照。

[0064] 青蒿素能够诱导肝癌细胞 HepG2 发生凋亡,且存在一定的量效关系:对照组的凋亡细胞数比例为 7%,1 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿素作用后细胞凋亡率为 9% ($p < 0.05$),10 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡率升至 14.95% ($p < 0.01$),25 $\mu\text{mol/L}$ 时为 15.45% ($p < 0.01$),50 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡细胞比例最高 (16.45%, $p < 0.01$) (图 3A)。相同条件下用双氢青蒿素处理 HepG2 细胞,不同浓度下调亡指数为:10 $\mu\text{mol/L}$ 时为 7.45%,25 $\mu\text{mol/L}$ 为 14.55%,50 $\mu\text{mol/L}$ 为 17.70%,凋亡指数显著高于对照细胞 ($p < 0.01$) (图 3A)。

[0065] Hep3B 细胞经青蒿素作用后,凋亡细胞明显增多并呈现量效关系:对照组凋亡指数为 0.80%,1 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿素作用后凋亡指数有所升高 (2.25%, $P < 0.05$),10 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡指数为 2.65% ($p < 0.01$),25 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡指数为 4.8% ($p < 0.01$),50 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡细胞比例最高 (25.35%, $p < 0.01$) (图 3B)。相同条件下双氢青蒿素也能够显著诱导 Hep3B 细胞发生凋亡:1 $\mu\text{mol/L}$ 双氢青蒿素作用后凋亡指数为 (2.15%, $p < 0.05$),10 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡指数为 12.90% ($p < 0.01$),25 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡指数为 28.75% ($p < 0.01$),50 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后多数细胞发生凋亡 (31.05%, $p < 0.01$) (图 3B)。

[0066] 青蒿素和双氢青蒿素均能诱导肝癌细胞凋亡,凋亡指数呈现浓度梯度依赖型增加。两种药物诱导 HepG2 细胞凋亡的能力基本一致,但作用于 Hep3B 细胞时双氢青蒿素较青蒿素显示出更强的诱导凋亡作用,说明不同肝癌细胞对青蒿素类药物诱导凋亡的敏感性存在差异,而且青蒿素类化合物对 p53 缺失的 Hep3B 细胞具有较强的诱导凋亡作用,提示该

类化合物可以通过非 p53 依赖方式诱导细胞凋亡。

[0067] 细胞生长曲线显示,青蒿素及双氢青蒿素能够增强吉西他滨的细胞毒作用,为深入了解青蒿素类药物的增敏作用及其机制,我们检测了青蒿素及双氢青蒿素联合吉西他滨对肝癌细胞凋亡的影响。吉西他滨单药处理 HepG2 细胞 48 小时,细胞的凋亡率均明显高于对照组:对照组凋亡率为 6.95%,吉西他滨单药作用后凋亡率显著升高(34.2%, $p < 0.01$),与青蒿素联合处理 HepG2 细胞,诱导凋亡能力增强:联合用药组凋亡率则显著增加至 55.5% ($p < 0.01$),明显高于吉西他滨单药组(34.2%, $p < 0.01$)及青蒿素单药组(14.95%, $p < 0.01$)(图 3C)。双氢青蒿素联合吉西他滨作用则表现出更强的诱导凋亡作用,其凋亡率为 61.0%,显著高于对照细胞(6.95%, $p < 0.01$)、双氢青蒿素单药组(7.45%, $p < 0.01$)、吉西他滨单药组(34.2%, $p < 0.01$)以及青蒿素联合吉西他滨组(55.5%, $p < 0.01$)(图 3C)。

[0068] 在相同条件下,青蒿素及双氢青蒿素联合吉西他滨作用于 Hep3B 细胞也显示出较强的诱导凋亡作用:对照组凋亡率为 0.8%,吉西他滨单药作用后凋亡率显著升高(14.7%, $p < 0.01$),青蒿素联合吉西他滨作用后细胞凋亡率则升至 31.9% ($p < 0.01$)(图 3D),双氢青蒿素联合吉西他滨显示出更强的诱导凋亡作用,凋亡率为 42.25% ($p < 0.01$)(图 3D)。在 Hep3B 细胞中,青蒿素及双氢青蒿素均显示出较强的增敏作用,显著提高吉西他滨诱导肝癌细胞凋亡的能力,表现出一定的协同作用。双氢青蒿素与吉西他滨联合应用显示出最强的诱导凋亡作用,与青蒿素比较,双氢青蒿素的增敏作用更强,再次证明了青蒿素类药物体外具有化疗增敏作用。

[0069] 实施例 4 青蒿素及其衍生物化疗增敏作用的体内实验

[0070] 如上所述,发明人通过细胞实验证明青蒿素以及双氢青蒿素在体外都显示出对于吉西他滨处理癌细胞的杀伤和诱导凋亡的增敏作用。在本实施例中,发明人通过裸鼠实验进一步证明它们对于体内肿瘤的化疗也一样有效。

[0071] 实验方案:

[0072] 人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 分别接种于 BALB/c 裸鼠皮下,建立人肝癌移植瘤模型,待肿瘤长至一定大小,根据不同组别用药。每隔两天测量肿瘤大小,治疗 4 周后,停止用药,用药情况为:

[0073] 1. 对照组:灌胃 0.2ml 生理盐水/天。

[0074] 2. 吉西他滨单药组:开始治疗起第 7、11、15 天,腹腔注射吉西他滨,单次用量为 80mg/kg。

[0075] 3. 青蒿素联合吉西他滨组:灌胃 ART 50mg/kg/day,第 7、11、15 天,腹腔注射吉西他滨单次用量为 80mg/kg。

[0076] 4. 双氢青蒿素联合吉西他滨组:灌胃 DHA 50mg/kg/day,第 7、11、15 天,腹腔注射吉西他滨单次用药量 80mg/kg。

[0077] 每隔两天测量肿瘤大小,治疗 4 周后停止用药,根据不同时间点每组肿瘤大小平均值绘制肿瘤生长曲线。

[0078] 2. 实验结果:

[0079] 如图 4 所示。

[0080] 荷 HepG2 移植瘤裸鼠经腹腔注射吉西他滨后肿瘤生长受到抑制,单药抑制率为

34.9%，青蒿素联合吉西他宾治疗后抑瘤率明显提高 (62.3%， $p < 0.01$)，高于吉西他宾单药治疗及青蒿素单药治疗 (30.0%， $p < 0.01$)，二者表现出协调作用 (见图 4A)。青蒿素联合吉西他宾对 Hep3B 裸鼠移植瘤的生长抑制作用也强于单药治疗：吉西他宾单药治疗的抑瘤率为 34.9%，与青蒿素联合后抑瘤率提高至 59.1% ($p < 0.01$)，联合用药的抑瘤效果优于吉西他宾单药治疗及青蒿素单药治疗 (29.4%， $p < 0.01$) (见图 4B)，因此青蒿素在体内能够增加吉西他宾的抗肝癌作用。

[0081] 双氢青蒿素联合吉西他宾应更能有效抑制肿瘤生长，对 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制率高达 78.4%，明显高于吉西他宾单药治疗 (34.9%， $p < 0.01$)、双氢青蒿素单药治疗 (36.1%， $p < 0.01$) 以及青蒿素联合吉西他宾治疗 (62.3%， $p < 0.01$) (见图 4C)。双氢青蒿素联合吉西他宾对 Hep3B 裸鼠移植瘤的生长抑制率也高达 70.1%，抑瘤作用明显强于单药治疗 (吉西他宾 34.9%， $p < 0.01$ ；DHA 34.2%， $p < 0.01$) 及青蒿素联合吉西他宾治疗 (59.1%， $p < 0.01$) (见图 4D)。

[0082] 结果表明，青蒿素和双氢青蒿素单药体内均具有抗肿瘤作用，双氢青蒿素的抑瘤作用强于青蒿素。青蒿素及双氢青蒿素均能增加吉西他宾的抑瘤作用，联合吉西他宾治疗效果优于单药，尤其是双氢青蒿素表现出显著的化疗致敏作用。

[0083] 实施例 5 青蒿素和双氢青蒿素联合吉西他宾治疗的体内毒副作用

[0084] 为了研究试验动物受化疗的毒性影响，发明人在药物治疗的过程中监测了裸鼠体重变化情况。人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 分别接种于 BALB/c 裸鼠皮下，建立人肝癌移植瘤模型，对青蒿素及双氢青蒿素不同剂量治疗组，及联合吉西他宾治疗组裸鼠体重进行监测，每隔两天测量裸鼠体重，直至 4 周后停止用药。

[0085] 试验结果显示：青蒿素和双氢青蒿素治疗过程中，动物身体无明显异常，与对照组比较，青蒿素 (图 5A) 和双氢青蒿素作用 (图 5B) 的毒性均低于吉西他宾，各组小鼠体重略有下降，但没有显著性差异，联合用药并未增加药物的毒副作用。荷 HepG2 移植瘤裸鼠在药物治疗前后，各组体重变化情况见表二，Hep3B 移植瘤治疗前后各组体重见表三。

[0086] 表 2HepG2 荷瘤裸鼠药物治疗前后体重变化情况

[0087]

治疗	治疗前体重 (g)	治疗后体重 (g)
盐水	18.50	16.01
吉西他宾 (80mg/kg)	18.70	15.80
ART (25 mg/kg)	18.70	16.20

[0088]

ART (50 mg/kg)	18.90	16.50
DHA (25 mg/kg)	19.10	16.60
DHA (50 mg/kg)	19.40	16.30
ART+ 吉西他宾	19.60	15.40
DHA+ 吉西他宾	18.40	16.00

[0089] 表 3Hep3B 荷瘤裸鼠药物治疗前后体重变化情况

[0090]

治疗	治疗前体重 (g)	治疗后体重 (g)
盐水	18.50	15.98
吉西他宾 (80mg/kg)	18.65	15.80
ART (25mg/kg)	18.68	16.20
ART (50mg/kg)	18.85	16.45
DHA (25mg/kg)	19.10	16.55
DHA (50mg/kg)	19.35	16.33
ART+ 吉西他宾	19.55	15.35
DHA+ 吉西他宾	18.40	15.95

[0091] 实施例 6 双氢青蒿素对于卡铂 (CBP) 处理卵巢癌细胞的增敏作用

[0092] 将人卵巢癌细胞系 (来源于美国 ATCC 菌种保藏中心) A2780 (p53 正常) 和 OVCAR-3 (p53 突变型) 以及永生化的人卵巢表面上皮细胞系 IOSE144 以一定密度 (3000 细胞/孔) 接种于 96 孔板, 过夜后加入不同浓度的 CBP (图 6A: 细胞存活抑制实验: 0、1、10、50、100 和 500 $\mu\text{mol/L}$ CBP; 图 6B: 细胞增殖活力抑制实验: 10 $\mu\text{mol/L}$ CBP), 同时每个 CBP 浓度加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA; 并以加有 DMSO ($< 0.1\%$) 但无药物处理的细胞为空白对照。药物处理 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2) 培养一定时间 (图 6A: 细胞存活抑制实验: 培养 48 小时; 图 6B: 细胞增殖活力抑制实验: 培养 0、24、48 和 72 小时;), 吸去培养液加入 MTT 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 小时; 之后吸去培养液, 加入 100 μL DMSO, 振荡使结晶充分溶解, 读取 570nm 光密度值 (OD 值)。结果均来自三次独立实验。)

[0093] 试验结果如图 6 所示。如图 6A 和 6B, 当与 DHA 联用时, CBP 非常显著地抑制了卵巢癌细胞的活力。事实上, 当细胞暴露于 1 μM CBP 和 1 μM DHA 时, A2780 细胞的存活率就降低了 69%, 而 OVCAR-3 细胞存活则减少了 72%。相比之下, IOSE144 细胞则显得对治疗较不敏感, 两种药物均以 1 μM 合用时存活率只降低了约 28% (图 6A, $P < 0.05$)。

[0094] 实施例 7 双氢青蒿素对于卡铂处理卵巢癌细胞的凋亡作用的增效作用

[0095] 将 A2780 和 OVCAR-3 细胞以一定密度 (5×10^5) 接种于 6cm 细胞培养皿; 培养过夜后加入 0 或 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 CBP、0 或 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA 单独或联合 (CBP+DHA) 处理 24 小时; 收集细胞培养皿内贴壁细胞及上清悬浮细胞, 进行 Annexin-V/PI 双染色; 以流式细胞仪定量检测收集细胞中凋亡细胞比例, 早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞数所占细胞总数百分比作为评估凋亡指数。

[0096] DHA 和 CBP 联合用药 24 小时后对 OVCAR-3 细胞凋亡有增效促进作用 (图 6C)。用 1 μM DHA 联合 500 μM CBP (1155%) 作用后的细胞凋亡率显著高于单独用 1 μM DHA (266%) 或 500 μM CBP (528%) 的细胞凋亡率, 而且超过了两种化合物的凋亡累加效应, 显示出的是一种潜在的增效作用。然而, A2780 细胞对联合治疗则显示的是累加效应而

不是增效效应。这可能是由于它们对 DHA 化合物的敏感度较低的缘故（图 6D, $P < 0.05$ ）。更长时间的作用可能产生更好的效果。

[0097] 实施例 8 双氢青蒿素对于卡铂治疗体内肿瘤的增效作用

[0098] 建立了 A2780 和 OVCAR-3 卵巢癌裸鼠异体移植瘤模型来检测 DHA 是否能在体内发挥其抗肿瘤效果。将人卵巢癌细胞 A2780 和 OVCAR-3 分别接种于 BALB/c 裸鼠（来源于上海斯莱克实验动物中心）腹股沟皮下，建立人卵巢癌小鼠移植瘤模型；待肿瘤长至可触摸大小时开始，根据不同处理（对照组、DHA10mg/kg 组、DHA25mg/kg 组、CBP120mg/kg 组及 DHA25mg/kg+CBP120mg/kg 组）组别对荷肿瘤小鼠进行用药治疗。治疗组小鼠每周给 DHA 治疗 5 天（次）。CBP 于第 0 天一次性给单一剂量（120mg/kg）。通过每天测量肿瘤的生长来评价药物的治疗效果。

[0099] 图 7 显示了其治疗结果。如图 7A（左栏）、B（左栏）所示，DHA（剂量为 10 和 25mg/kg）分别导致 A2780 异体移植肿瘤 24% 和 41% 的生长抑制（与给生理盐水的对照组相比）（ $P < 0.05$ ），OVCAR-3 模型 14% 和 37% 肿瘤生长抑制（ $P < 0.05$ ）；只给单一 CBP 的治疗组肿瘤生长被抑制了 56%（A2780）和 46%（OVCAR-3）。联合用药（25mg/kg DHA）组则在 A2780 和 OVCAR-3 动物肿瘤中均产生 70% 肿瘤生长抑制（ $P < 0.05$ ）。同时，基于对体重的（图 7A 右栏和图 7B 右栏）观察，实验当中只有接受 CBP 治疗的小鼠有轻微的体重减少，也没有观察到其他的药物宿主毒性。因此，CBP 和 DHA 联合使用对于小鼠并没有显著的毒性作用，是安全可靠的。

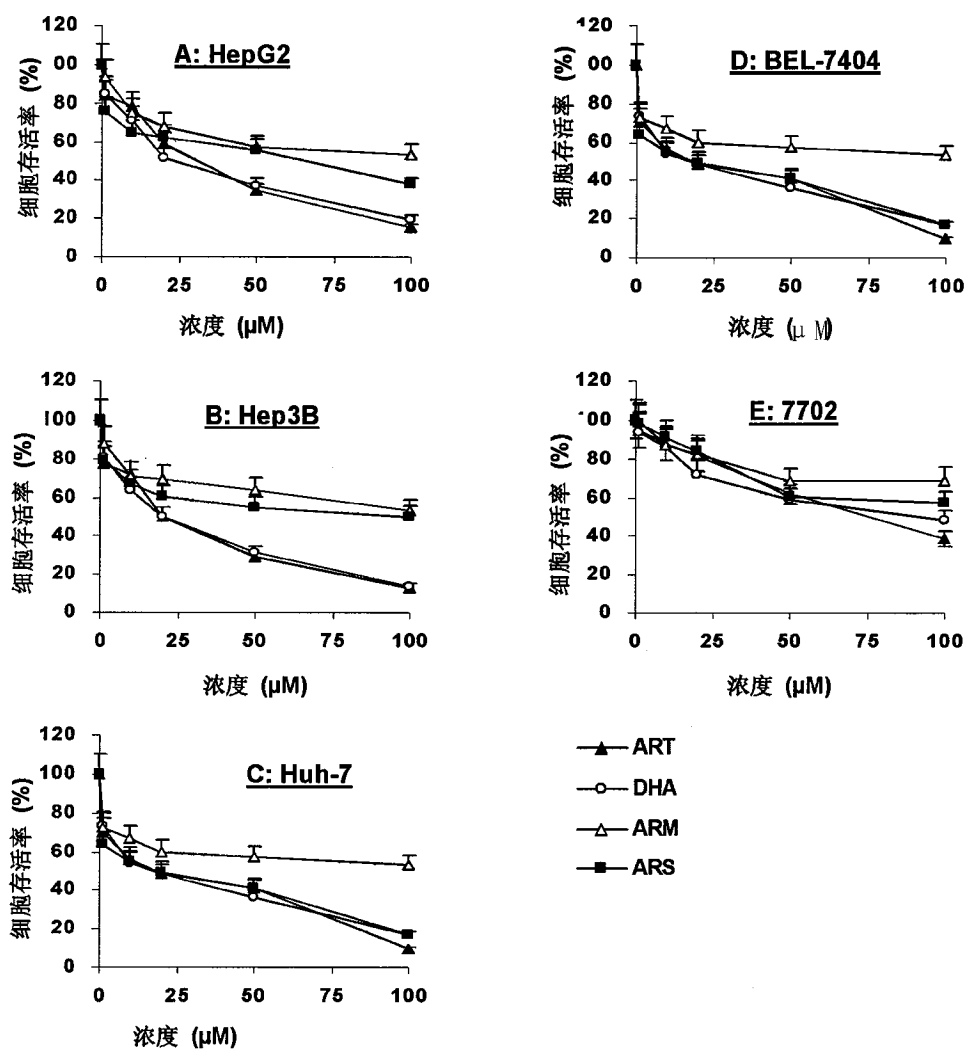


图 1

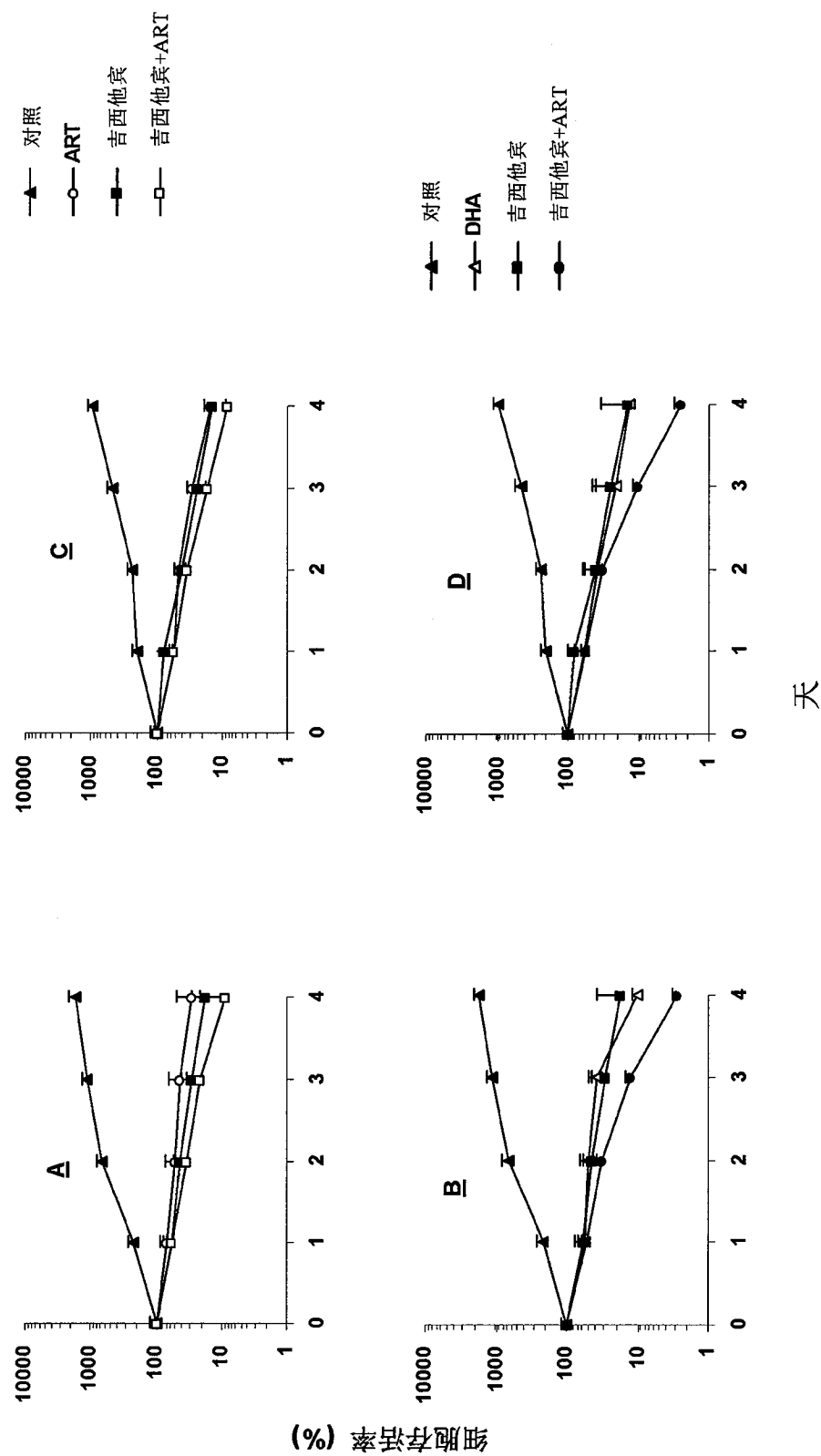


图 2

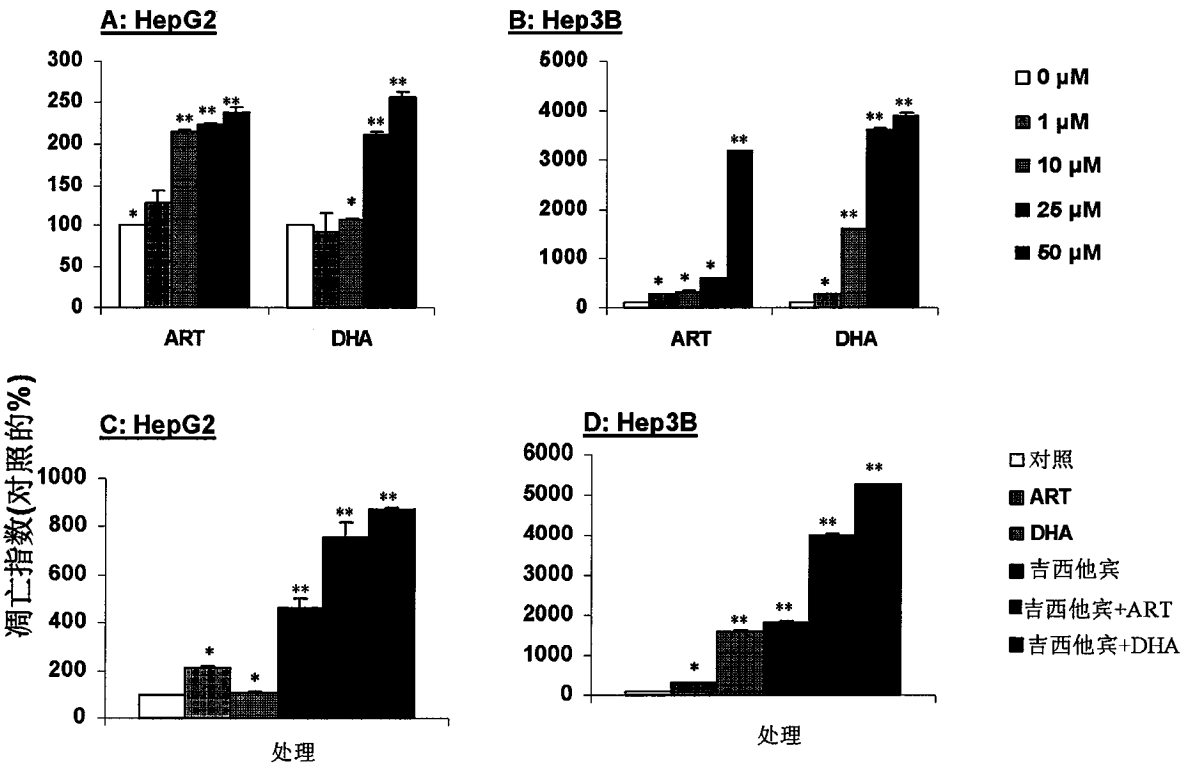


图 3

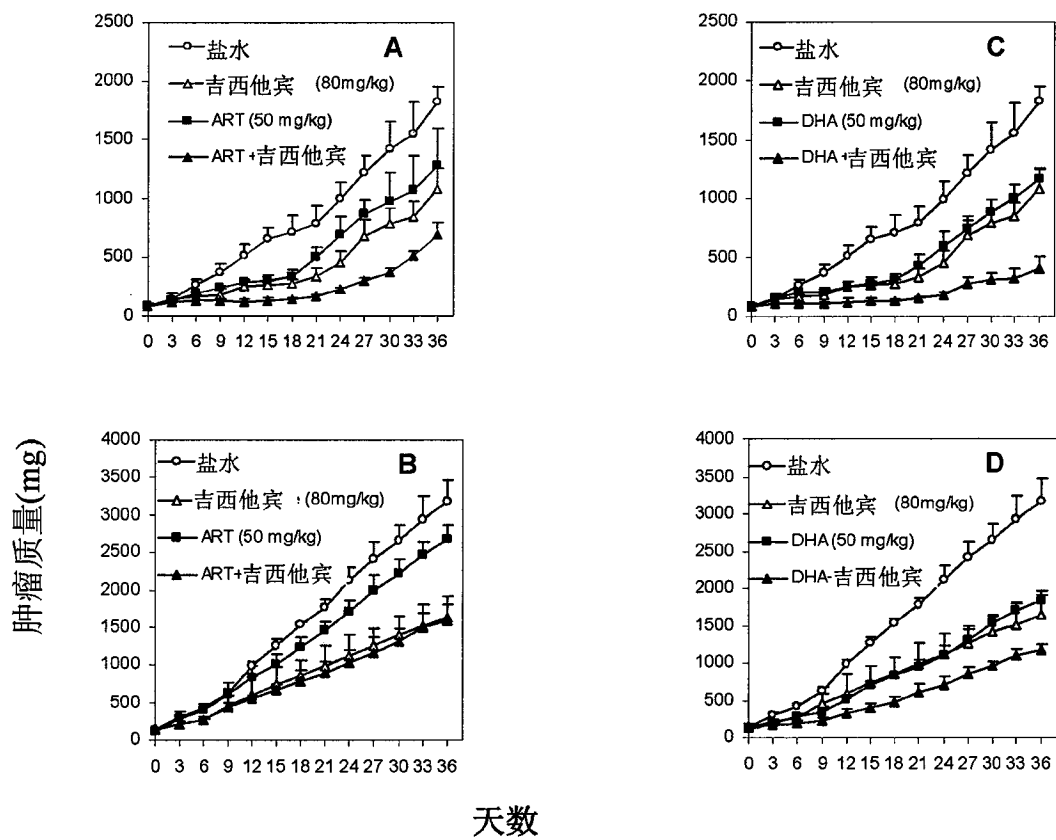


图 4

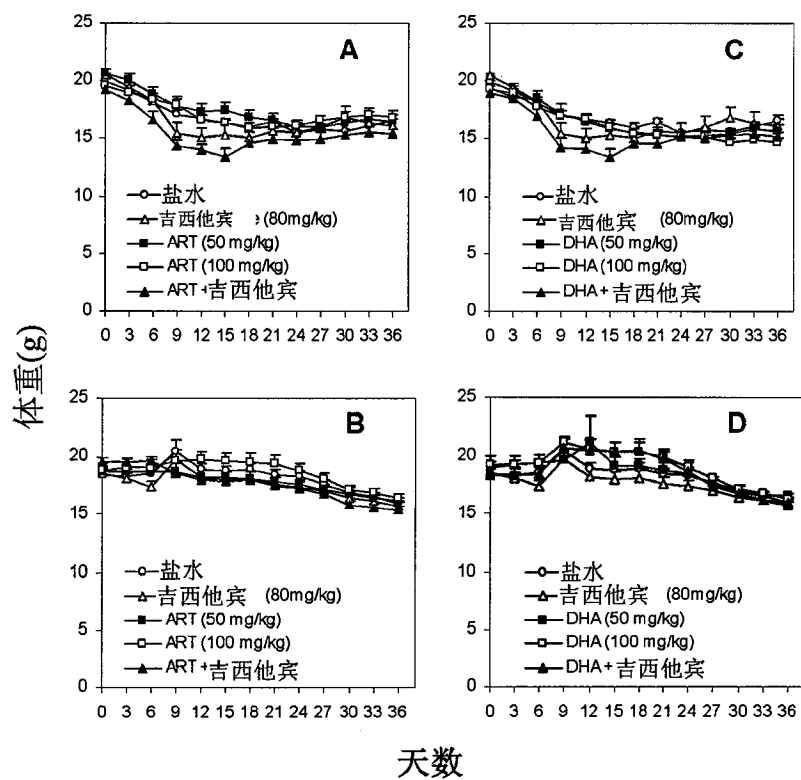


图 5

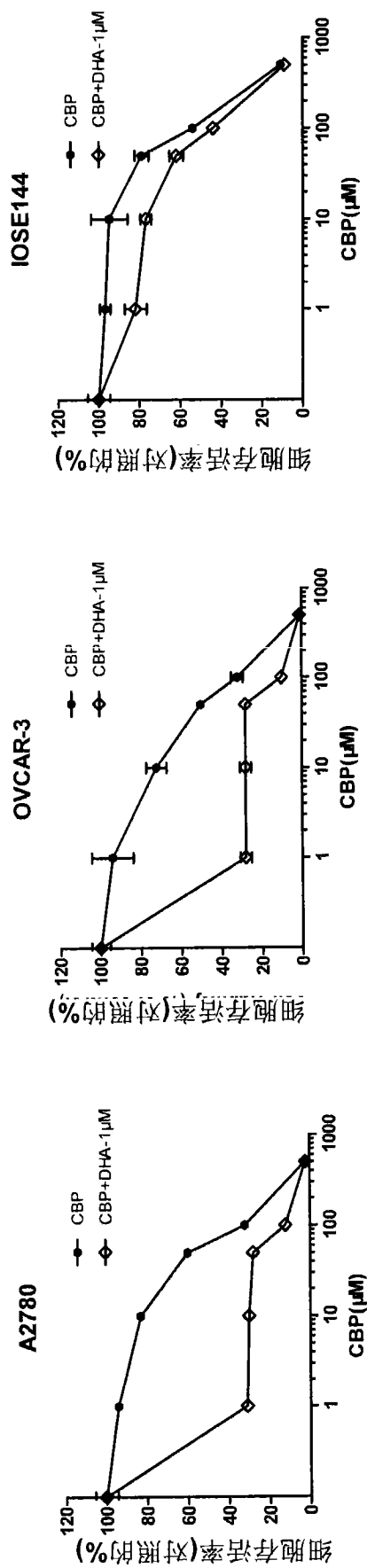


图 6A

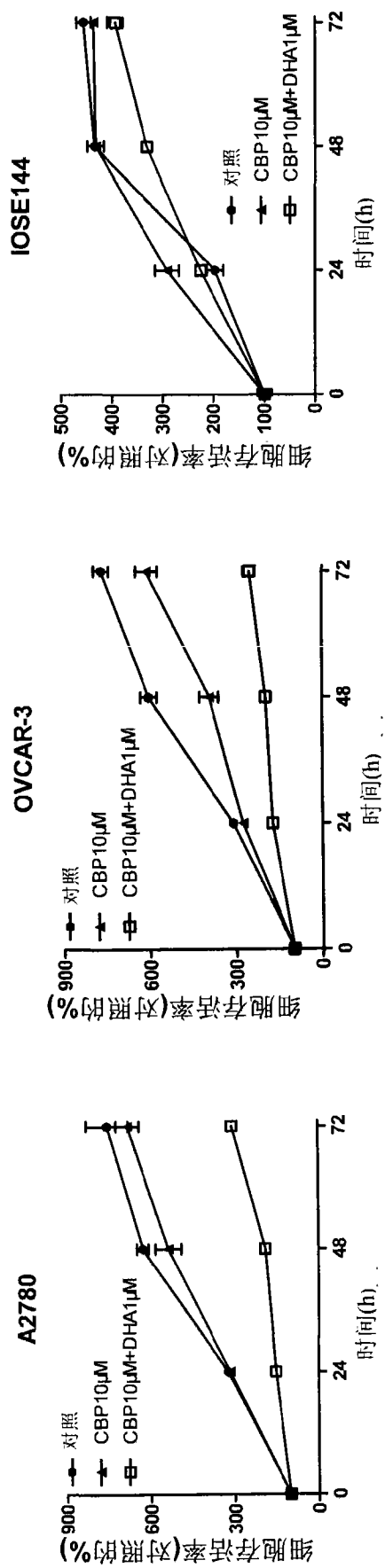


图 6B

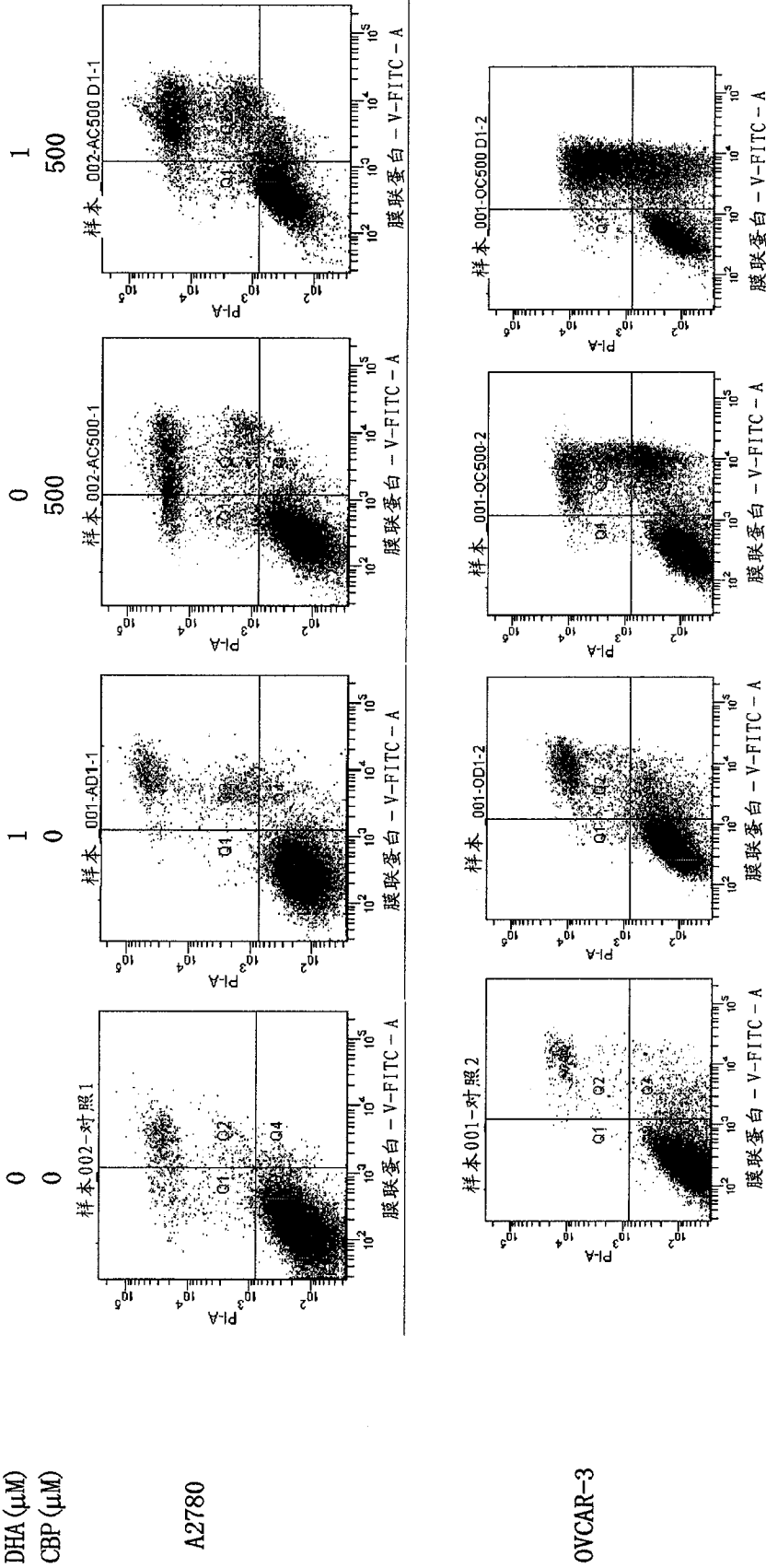


图 6C

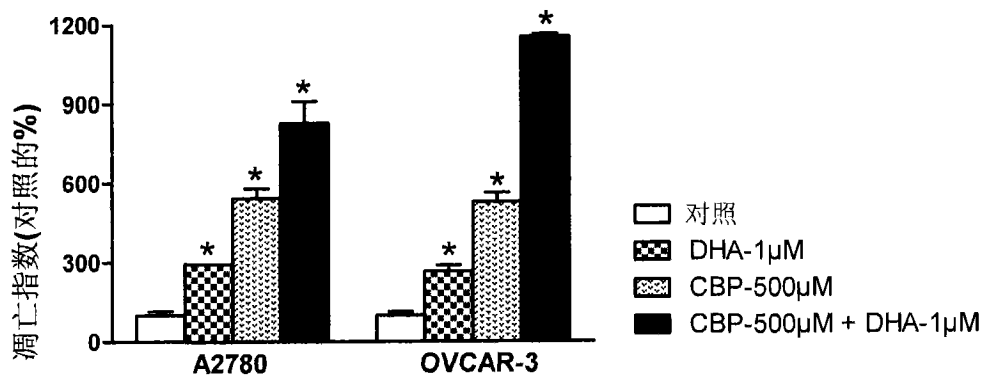


图 6D

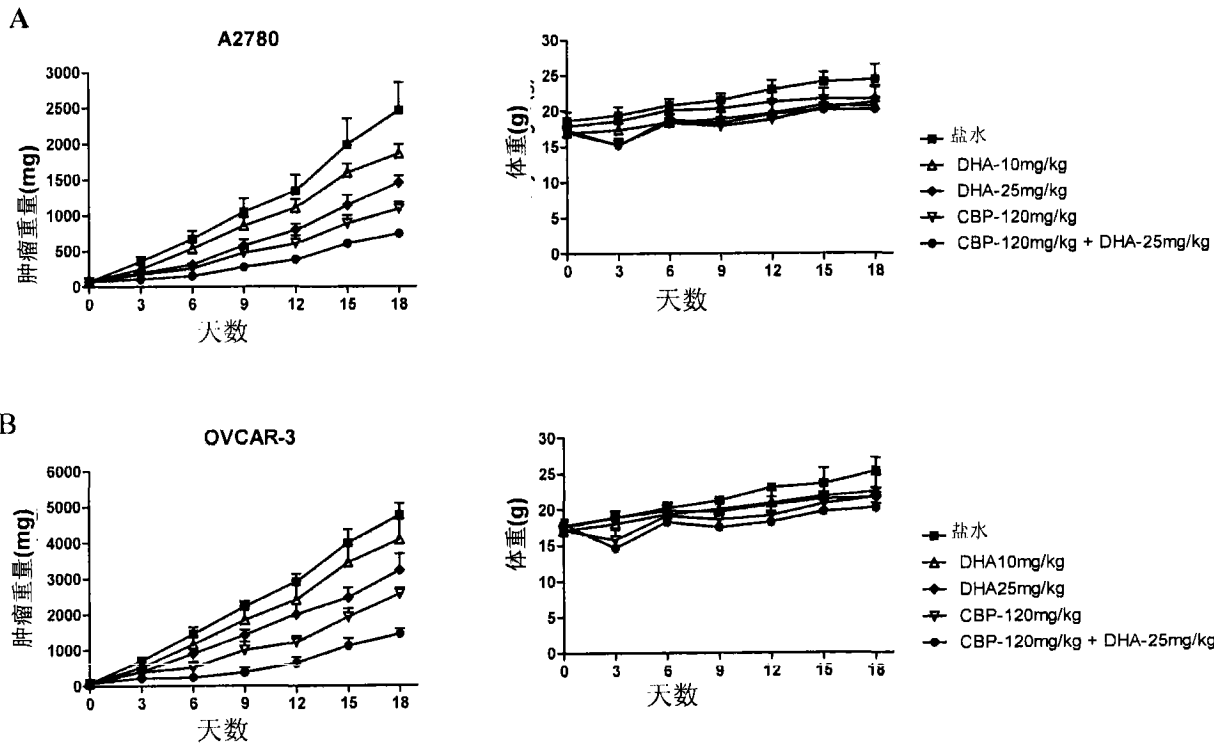


图 7